

養殖イシダイの新細菌性疾病について

畑井喜司雄・安元 進・安永 統男

A New Bacterial Disease of Cultured Japanese Striped Knifejaw, *Oplegnathus fasciatus*

Kishio HATAI, Susumu YASUMOTO and Norio YASUNAGA

1979年1月に長崎県五島の一養魚場で飼育されているイシダイの2年魚にへい死を伴う流行病が発生した。本症の流行は長期にわたり、6月下旬に至るまで継続した。羅病魚から細菌の培養を試みたところ、各臓器から純培養的に起病性を有する細菌が分離されたので本症は細菌性疾病であると診断された。

本症の発生概要ならびに分離菌の性状等について述べる。

材料および方法

細菌の分離・培養 本症によるへい死は約半年間継続した。この間1月11および17日、4月13日、6月20日の4回にわたり調査を実施し、病魚から細菌の培養を試みた。これらの調査で1月11日には普通寒天培地を、また、1月17日にはブレインハートインヒュージョン(以下BHIと略称)寒天培地を分離培地として用いた。しかし、4月13日には1.0%寒天加SIM培地(栄研)を、また、6月20日には1.15%寒天加CTA培地(ニッサン)を用いた。これはSIM培地が1月11日の調査結果から、また、CTA培地は以下に述べる発育最適培地の試験結果から本症原因

菌の培養に適すると判定されたことによっている。

発育最適培地の検討 12種類の市販乾燥培地を用い、ミスラ法¹⁾にて検討した。この際、各培地には食塩および寒天を各々0.5%および1.5%となるように加えた。平板への菌の接種は0.5%NaCl, 1%寒天加SIM培地(以下NA-SIM培地と略称)での20°C, 4日間培養菌を生理食塩水に懸濁させ(湿菌量で1mg/ml), それを原液として10倍希釈系列を作製し、滅菌注射器(1ml)にて3滴(約0.012ml)ずつ滴下する方法によった。そして20°C, 7日間培養後に集落がまったく出現しない場合を一、低希釈段階で発育がみられた場合を十、高希釈段階で発育がみられた場合を卅として示し、卅と判定された培地は本菌の発育に適すると判断した。なお、本試験にはNC-7905株(表1)を用いた。

病原性試験 イシダイに対する病原性試験は血液寒天培地(栄研)での20°C, 3日間培養菌を用い、魚体重100g宛湿菌量として10, 1, 0.1, 0.01, 0 mgの各量を0.2mlの生食に懸濁させて背部筋肉内に接種する方法によった。供試魚の平均体重は50.7gで、各接種群宛4~5尾用いた。試験期間中の平均水温は16.6°Cであった。

表1 罹病イシダイから分離された
JSK-Achromobacter の由来
Table 1 Source of 6 strains of JSK-
Achromobacter isolated from diseased fish
(*Oplegnathus fasciatus*)

Strain No.	Date	Source	Site	Location
NC-7903	13, Apr., 1979	Fish No. 1.	Kidney	Nagasaki Pref.
NC-7904	〃		1. Eye	〃
NC-7905	〃		2. Kidney	〃
NC-7906	20, Jun., 1979		3. Eye	〃
NC-7907	〃		3. Muscle	〃
NC-7908	〃		4. Kidney	〃

次にイシダイを対照魚として、マダイ、ブリ、およびウナギに対する病原性試験を実施した。人為感染は体重100g宛湿菌量として1mgを0.2mlの生食に懸濁させ、同様に背部筋肉内に接種する方法によった。供試魚の平均体重はイシダイ、マダイ、ブリおよびウナギで各々56.7, 70.0, 6.7, 76.7gであった。供試尾数は各3尾で試験期間中の平均水温は25.3°Cであった。なお、これらの病原性試験にはNC-7905株を用いた。

分離菌の性状試験 供試株は表1に示す6株を用い、常法に従い実施した。ただし、菌の運動性は温度勾配培養装置 (Model TN-3, 東洋科学産業) を用い種々の温度で培養したものの懸滴標本より判定した。この場合、培地はCTAプロス (CTA半流動寒天培地を冷水で溶解後、ろ紙でろ過したろ液) を用いた。糖からの酸の産生は、基礎培地としてCTA培地を用いた。

pH・温度・NaCl耐性試験 pH耐性試験は各pH値に調整されたCTAプロスを10mlずつ試験管に分注し、これにCTAプロスで20°C, 24時間培養菌の0.1mlを接種し、20°Cにて振とう培養する方法で実施し、培養7日後までの菌の発育の有無を観察した。供試株はNC-7905およびNC-7908の2株 (表1)

を用いた。

温度耐性試験はCTAプロスを用い、温度勾配培養装置を使って実施した。培地への菌の接種はCTAプロスで20°C, 48時間培養菌の0.1mlとした。なお、培養7日後に発育の認められなかった試験は、27°Cで培養しなおす方法によりその生存性を確認した。本試験ではNC-7905株を用いた。

NaCl耐性試験は1%寒天加SIM培地に種々の濃度にNaClを添加した培地を作製し、ミスラ法で実施した。培地への菌の接種方法は前述の方法に準じた。本試験にはNC-7905株を用いた。

薬剤感受性試験 供試6株に対する塩酸テトラサイクリン (TC), クロールテトラサイクリン (CTC), オキシテトラサイクリン (OTC), クロラムフェニコール (CP), アンピシリン (Amp) およびニフルスレチン酸ソーダ (NF-Na) の最小発育阻止濃度 (MIC) を寒天希釈法により測定した。培地はCTA培地を用い、CTAプロスで25°C, 48時間培養菌の1白金耳を塗抹した後、25°Cで48時間培養後に判定した。

結果および考察

本症の発生概要 疾病の発生がみられたイシダイは1977年11月に韓国から種苗 (平均体重約10g) として輸入され、飼育されてきたものである。本症に起因するへい死は1979年1月上旬からみられはじめ、図1に示すような累積へい死の曲線を示したが、へい死がみられるようになった時点での養殖尾数は約8万5千尾、平均体重は約260g、水温は17~8°Cであった。その後水温は2月上旬に約15°Cに低下し、それから徐々に上昇してきたが、へい死は6月下旬

に水温が22°Cを越える時点まで継続した。この間の累積へい死尾数は約1万7千尾に達した。もし水温が上昇したことにより本症が終息したのであれば本症は低水温期の疾病と考えられるが、6月上旬に水産用テラマイシン散の経口投与が実施されているため終息因を明確にすることはできなかった。

羅病魚は体表が「スレ」様の外観を呈し、粘液の分泌が多く出血がみられた(図2)。また、眼球白濁を呈する個体も多かった(図3)。これらの病魚は遊泳が不活発となり、摂餌せず生蚝のすみで浮遊していることが多く、急速に致死することはないものと推察された。

内部所見では脾臓および腎臓が腫大しており、また、胃や腸に水様物が充満している個体も多くみられた。

細菌の分離・培養 病魚の腎臓より普通寒天培地を用いて細菌の培養を試みた結果、純培養的に集落が出現したが、本菌を普通寒天培地で継代することはできなかった。この際、性状試験を行うために本菌をSIM培地に接種したところ比較的良好な発育を示した。従って、SIM培地は本菌の培養に適すると判断された。しかし、BHI寒天培地で培養を試みた結果、集落の発現はまったくみられなかった。次にSIM培地およびCTA培地での培養では腎臓、体表の病患部、眼球白濁部位などから純培養的に該菌の良好な発育がみられた。得られた集落から無作為

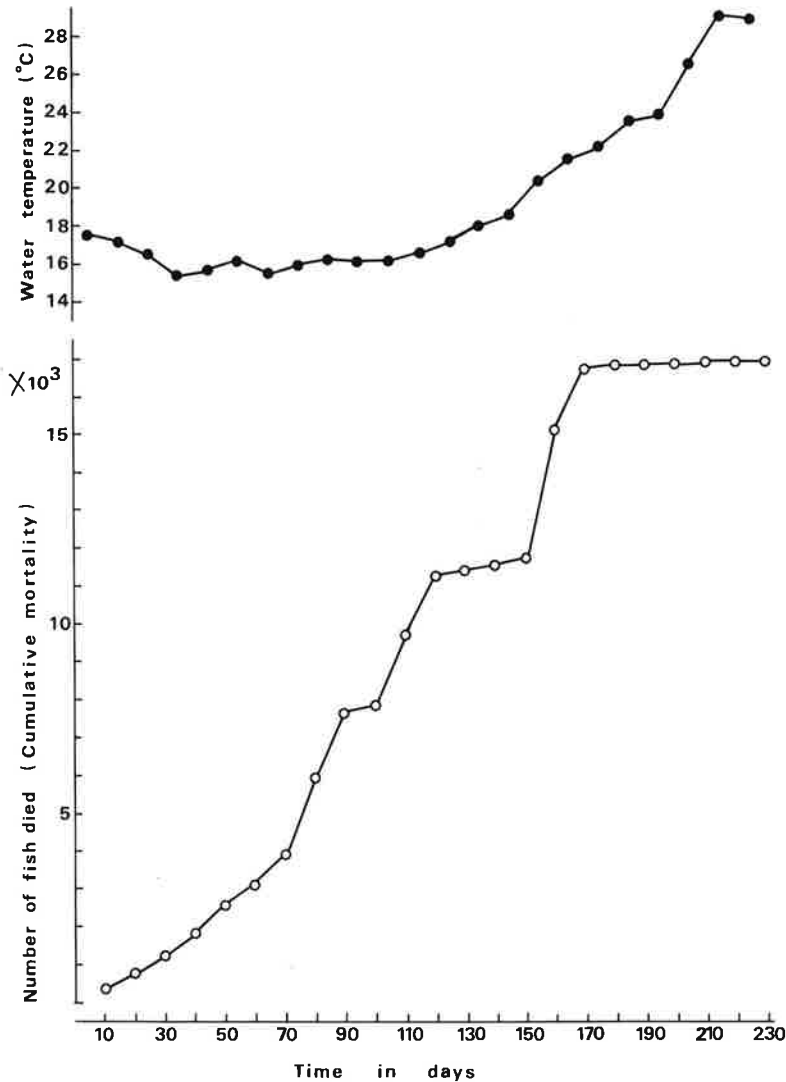


Fig. 1 Mortality of Japanese striped knifejaw (*Oplegnathus fasciatus*) due to bacterial disease (Comparison of cumulative number of fish died between water temperature).

図1 細菌性疾病に起因するイシダイのへい死(累積へい死数と水温との比較)

に釣菌した株を表1に示した。

発育最適培地の検討 供試12種類の培地中、+に判定された培地はキングAおよびキングB培地であり、+に判定された培地はNA-SIM培地、感性ディスク用培地およびCTA培地であった(表2)。また他の7種類の培地では発育がみられず-と判定

された。+の発育を示した3種類の培地に共通していることは、これらの培地の中にシステインが含まれているということであった。従って、システインが本菌の発育を促進させることは明らかであるが、発育に不可欠な因子であるか否かは今後さらに検討を要するものと思われる。

表2 種々の培地で20°C, 7日間培養された JSK-Achromobacter, NC-7905株の発育
Table. 2 Growth of JSK-Achromobacter, strain NC-7905 incubated at 20°C for 7 days on various media

Media	Growth
Nutrient agar "Eiken"	-
Brain Heart Infusion agar "Eiken"	-
Heart Infusion agar "Eiken"	-
SS agar "Eiken" (0.5% NaCl, 0.15% agar)	-
NAC agar "Eiken" (0.5% NaCl)	-
King A agar "Eiken" (0.5% NaCl)	+
King B agar "Eiken" (0.5% NaCl)	+
SIM semisolid agar "Eiken" (0.5% NaCl, 1% agar)	++
Sensitivity test agar "Eiken" (0.5% NaCl)	-
Sensitivity disc agar "Nissui" (0.5% NaCl)	++
CTA agar "Nissan" (1.15% agar)	++
Sellers medium "Nissan" (0.3% NaCl)	-

病原性試験 イシダイに対する病原性試験の結果(表3), NC-7905株は0.01 mg 接種した場合でも10日以内に全数へい死させ得る病原性を有した。またへい死魚の外観的の症状は自然発症魚と同一であった(図4)。瀕死魚の腎臓から接種菌を回収することができたことから本菌を本流行病の原因菌と断定することができた。

次に、他の魚種に対する病原性を試験した結果(表4), 対照として供試したイシダイでは5日以内に全数へい死し、またブリでは5日以内に2尾、そして8日目に1尾と全てへい死したのに対し、マダイおよびウナギでは病徴の発現もなくへい死もみられなかった。しかし、へい死したイシダイでは顕著な症状が発現され、臓器から該菌が回収されたのに対し、ブリではまったく症状がみられなかった。しかしブリでも臓器から該菌が再分離されたことから、へい

表3 JSK-Achromobacter, NC7905株の人為感染に起因するイシダイのへい死
Tabbe. 3 Mortality of Japanese striped knifejaw (*Oplegnathus fasciatus*) due to artificial infection of JSK-Achromobacter, strain NC-7905

Injection size per 100g B. W.	No. of fish*used	Number of fish died								Total	Mortality (%)
		Days after inoculation									
		3	4	5	6	7	8	9	10		
10mg	4	3	1							4	100
1	5		3	2						5	100
0.1	5			1	1	3				5	100
0.01	5					1	0	2	2	5	100
0	5									0	0

* The body weight of fish used was 15 to 140g, average 50.7g, at the beginning of experiment. The water temperature was 15.5 to 18.0°C, average 16.6°C, during the course of experiment.

畑井・安元・安永：養殖イシダイの新細菌性疾病について

表4 JSK-Achromobacter, NC-7905 株に対する4魚種の感受性に関する感染試験結果
Table.4 Results of inoculation experiments on the susceptibility of 4 species of fishes to JSK-Achromobacter, strain NC-7905.

Common name of fish used*	Average weight of fish (g)	Number of fish died**								Total	Mortality (%)
		Days after inoculation									
		3	4	5	6	7	8	—	11		
Japanese striped knifejaw	56.7		2	1						3	100
Red sea bream	70.0									0	0
Yellowtail	6.7		1	1			1			3	100
Eel	76.7									0	0

* Scientific name of fish : Japanese striped knifejaw (*Oplegnathus fasciatus*), Red sea bream (*Pagrus major*), Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), Eel (*Anguilla japonica*)

** Number of fish used was 3 in each experiment.

The water temperature was 24.8 to 26.0°C, average 25.3°C, during the course of experiment.

表5 罹病イシダイから分離された JSK-Achromobacter 6 株の生化学的性状
Table.5 Biochemical characteristics of 6 strains of JSK-Achromobacter isolated from diseased Japanese striped knifejaw (*Oplegnathus fasciatus*).

Characteristics	6 strains	Characteristics	6 strains
Gram stain	—	Acid production from	
Morphology	rod. 0.3 x 1.5-4.0 μ	Glucose	—
Motility		Arabinose	—
11.3°C	—	Xylose	—
16.4	—	Rhamnose	—
20.8	—	Fructose	—
24.8	—	Galactose	—
29.2	—	Mannose	—
Cytochrome oxidase	+	Lactose	—
Production of		Maltose	—
Catalase	+	Raffinose	—
Indole (SIM)	—	Sucrose	—
Hydrogen sulfide (SIM)	—	Starch	—
Urease	—	Dextrin	—
Pigment (King A)	—	Salicin	—
" (King B)	—	Mannitol	—
Reduction of		Inositol	—
Nitrate	—		

死は本菌によるものと判定した。

これらのことから本菌はイシダイに対し、とくに強い病原性を有すると判断された。従って、今後イシダイ養殖において本症の発生には十分な留意が必要と思われる。

分離菌の性状試験 性状試験に供した6株はすべて同一性状を有したことから表5に一括して示した。生化学的性状試験の結果、本菌はグラム染色(-)、チトクロームオキシダーゼ(+),カタラーゼ(+),インドール(-),硫化水素(-),尿素

(一)、硝酸塩還元(-)、色素産生(-)、糖からの酸産生(-)などの性状を示した。また運動性は種々の温度で培養したものについて4日および7日後に検査したがまったく認められなかった。

以上述べた如く、本菌は非運動性で色素を産生せず、糖を利用しないグラム陰性の桿菌であったが、この性状は Shewan ら²⁾の分類に従うと *Achromobacter* 属に含められる。しかし、現在の Bergey の第8版³⁾における分類では *Achromobacter* 属は抹消されており、かつて *Achromobacter* 属に属していた菌は *Acinetobacter* 属または *Moraxella* 属に含められている。Bergey の第8版に記載されているこれらの属の大きな特徴は *Acinetobacter* 属がチトクロームオキシダーゼ(-)、また *Moraxella* 属が球桿菌であるということである。ところがイシダイからの分離株はチトクロームオキシダーゼ(+)であり、かつ長桿菌である性状を有することからいずれの属にも含め得ないことになる。従って、本菌はさらに詳細な性状検査を行い、その上で分類上の位置が再検討されるべきであろうが、前述の如き、Shewan ら²⁾の分類に従えば *Achromobacter* に属することは明瞭である。また、現在でも *Achromobacter* の名称を用いている研究者も少なくない。そこで、本報ではある程度本菌の分類的位置が明らかとなり、かつ、イシダイから分離された菌であるという内容を示す JSK-*Achromobacter* と仮称しておきたい。なお、JSKはイシダイ (Japanese striped knifejaw) の頭文字を採用したものである。

pH・温度・NaCl耐性試験 pH耐性試験の結果(表6)、供試株の発育はpH6.8から9.3の範囲内でみられたが、至適pH域はpH7.2から8.4の間と判断された。

表6 JSK-*Achromobacter*, NC-7905 および NC-7908 株の発育に及ぼす pH の影響

Table. 6 Effect of pH on growth of strain NC-7905 and strain NC-7908 of JSK-*Achromobacter* in CTA broth.

pH values after autoclaving	strain NC-7905			strain NC-7908		
	Growth-rate at day after incubation*			Growth-rate at day after incubation*		
	1	3	7	1	3	7
6.1	-	-	-	-	-	-
6.8	-	+	+++	-	++	++
7.2	+	+++	+++	+	++	++
7.9	++	+++	+++	++	+++	+++
8.4	++	+++	+++	+	+++	+++
8.8	+	++	+++	±	+	++
9.3	-	-	+	-	-	+
9.8	-	-	-	-	-	-

*Symbols; - : indicates no growth, ± : barely visible growth, + ++ +++ : increasing amounts of growth from slight to excellent.

表7 JSK-*Achromobacter*, NC-7905 株の発育に及ぼす温度の影響

Table. 7 Effect of temperature on growth of JSK-*Achromobacter*, strain NC-7905 in CTA broth.

Temperature (°C)	Growth-rate at day after incubation*			Survival**
	1	3	7	
2.6	-	-	-	+
4.2	-	-	±	+
6.3	-	-	+	
8.1	-	-	+	
9.6	-	-	+	
11.3	-	+	+	
.	.	.	.	
16.4	-	+	+++	
17.5	+	++	+++	
.	.	.	.	
22.8	+	++	+++	
23.7	+	+++	+++	
24.8	+	+++	+++	
25.8	++	+++	+++	
26.8	++	+++	+++	
27.8	+	++	+++	
29.2	+	++	+++	
30.1	-	-	±	+
31.0	-	-	-	+
32.1	-	-	-	-

*Symbols; - : indicates no growth, ± : barely visible growth, + ++ +++ : increasing amounts of growth from slight to excellent.

** Viability of inoculated cells was checked by re-incubation of the culture after 7 days at about 27°C for more 5 days.

温度耐性試験の結果(表7), 培養1日後では17.5~29.2°Cの範囲内で発育がみられ, とくに26~7°Cにおいて良好な発育を示した。培養3日後では11.3~29.2°C, また7日後では4.2~30.1°Cの範囲内で発育がみられたことから, 本菌は広い温度範囲内で発育を示すことが明らかとなった。培養7日後に発育の認められなかった温度における接種菌の生存性を確認した結果, 2.6および31.0°Cでは生存性が確認されたが32.1°C以上では発育がみられず死滅したものと判断された。

NaCl耐性試験の結果(表8), 本菌はNaCl 0~3.5%の範囲内で発育を示したが至適NaCl濃度は0~0.75%の間と判断された。

表8 JSK-Achromobacter, NC-7905株の発育に及ぼすNaCl濃度の影響

Table 8 Effect of NaCl concentration on growth of JSK-Achromobacter, strain NC-7905 incubated at 20°C for 7 days on SIM semisolid agar "Eiken" (plus 1% agar) containing various amounts of NaCl.

Concentration of NaCl	No. of viable cells at each level of dilution*			
	10 ⁰	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶
0 %	>100	>100	>100	15
0.25	>100	>100	>100	15
0.5	>100	>100	>100	20.3
0.75	>100	>100	>100	19
1.0	>100	>100	>100	8.7
1.5	>100	>100	>100	11.3
2.0	>100	>100	>100	0
2.5	>100	>100	0	0
3.0	>100	0	0	0
3.5	0	0	0	0

* average (n = 3)

薬剤感受性試験 MIC値は菌株により若干異ったが, それらの値はTCでは0.8~1.6μg/ml, CTCでは0.1~0.4μg/ml, OTCでは0.2~0.8μg/ml, CPでは0.4~0.8μg/ml, Ampでは>3.1μg/mlおよび

表9 JSK-Achromobacterに対する6種類の化学療法剤の最小発育阻止濃度(M. I. C.)

Table 9 Minimal inhibitory concentrations (M. I. C.) of 6 chemotherapeutics for JSK-Achromobacter.

Strains	MIC (μg/ml)*					
	TC**	CTC	OTC	CP	Amp	NF-Na
NC-7903	1.6	0.4	0.8	0.8	>3.1	25
NC-7904	1.6	0.4	0.8	0.8	>3.1	25
NC-7905	0.8	0.4	0.4	0.8	>3.1	12.5
NC-7906	0.8	0.1	0.2	0.4	>3.1	3.1
NC-7907	0.8	0.1	0.2	0.4	>3.1	3.1

* MIC after incubation for 48 hours at 25°C.

** TC; Tetracycline hydrochloride, CTC; Chlorotetracycline, OTC; Oxytetracycline, CP; Chloramphenicol, Amp; Ampicillin, NF-Na; Sodium nifurstyrenate.

NF-Naでは3.1~25μg/mlであった(表9)。従って, 本菌はTC, CTC, OTCおよびCPに感受性を有すると判断され, 養殖現場での治療にもこれらの抗生物質は期待がもてると判断された。

要 約

- 1979年1月に養殖イシダイの2年魚にへい死を伴う流行病が発生した。本症は約6ヶ月間の長期間にわたり蔓延したが, この間数回にわたり調査をおこなった。
- 罹病魚の外観的病徴は体表が“スレ”を呈し, 粘液の分泌が多く出血がみられることで, 重篤魚は遊泳不活発となり摂餌をしなくなりへい死する。
- 病魚を詳査した結果, 臓器から純培養的に起病性を有する細菌が分離されたことから, 本症は細菌性疾病であると診断された。
- 分離菌は非運動性で色素を産生せず, 糖を利用しないグラム陰性の桿菌であり, 既知の魚病菌とは異なった。本菌の分類的位置を明確にするため

にはさらに詳細な性状検査を要するため、本報では本菌を JSK-Achromobacter と仮称するにとどめた。

5. 本菌はpH7.2~8.4, 温度26~7°C, NaCl濃度

0~0.75%の範囲で良好な発育を示した。

6. 本菌は TC, CTC, OTC, および CP に対して感受性を有し, Amp および NF-Na に対しては耐性であった。

文 献

1) 坂崎利一, 1978: 新細菌培地学講座(上), 近代出版, 東京, 419 pp.

2) J. M. Shewan, G. Hobbs and W. Hodgkiss, 1960: *Pseudomonas* and *Achromobacter* groups of bacteria in the spoilage of marine white fish,

J. Appl. Bact., 23 (3), 463-468.

3) R. E. Buchanan and N. E. Gibbons, 1974: *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, 1246 pp.

Abstract

From Jan. to Jun. in 1979, an epizootic of bacterial disease occurred among Japanese striped knifejaw, *Oplegnathus fasciatus* at a fish farm in Nagasaki Prefecture. In moribund fish hemorrhagic areas occur in various part of the body. A bacterium was purely isolated by streaking materials taken from lesions of diseased fish onto SIM agar or CTA agar and incubating at 20°C. Inoculation experiments using Japanese striped knifejaw showed that the bacterium was the causative agent. The biochemical characteristics of 6 strains of bacterium isolated from diseased Japanese striped knifejaw was summarized in Table 5. As the results, the bacterium belonged to the genus *Achromobacter* according to SHEWAN *et al.*²⁾ from its characteristics. As its genus is not recognized at present³⁾, however, the organism named tentatively as JSK-Achromobacter (Japanese striped knifejaw-Achromobacter).

The JSK-Achromobacter grew at a pH range of 6.8 to 9.3, with the optimum of 7.2-8.4. It grew well on SIM agar containing 0-0.75% NaCl, although did through a range of NaCl contents between 0 and 3.0%. At 3.5% NaCl or above the growth failed to occur on the medium. In CTA broth, it grew at a temperature range of 4.2 to 30.1°C, with the optimum of 16.4-29.2°C.

MIC levels of TC, CTC, OTC, CP, Amp and NF-Na for 5 strains of JSK-Achromobacter were within a range from 0.8-1.6 µg/ml, 0.1-0.4 µg/ml, 0.2-0.8 µg/ml, 0.4-0.8 µg/ml, 3.1 µg/ml and 3.1-25 µg/ml, respectively.

図版の説明

Explanation of plate

図2 JSK-Achromobacterに自然感染した養殖イシダイの外観症状。大部分の病魚は体の各部に出血を呈した。

Fig. 2 External symptoms of cultured Japanese striped knifejaw, *Oplegnathus fasciatus* naturally infected with JSK-Achromobacter. Most of diseased fish showed hemorrhagic condition in various parts of the body.

図3 JSK-Achromobacterに自然感染した養殖イシダイの外観症状。眼球白濁を呈している。

Fig. 3 External symptoms of cultured Japanese striped knifejaw naturally infected with JSK-Achromobacter. Note turbidity of eyeball.

図4 魚体重100g宛0.1mgのJSK-Achromobacterを筋注された養殖イシダイの外観。へい死魚は自然感染魚と同一症状を示した。

Fig. 4 Gross appearance of cultured Japanese striped knifejaw intramuscularly injected with 0.1mg of viable cells of JSK-Achromobacter per 100g fish body weight. Moribund fish showed the same gross symptoms as observed in naturally infected fish.



図 2



図 3

図 4

